

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450498

研究課題名(和文)糸状菌由来セルロース膨潤タンパク質の機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of swollenin produced by filamentous fungi

研究代表者

野崎 功一 (NOZAKI, Kouichi)

信州大学・学術研究院工学系・准教授

研究者番号：10313834

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：セルロース膨潤タンパク質Swolleninの反応機構とセルラーゼの反応促進における役割を解明することに成功した。また、Swolleninの作用によるセルロースの構造変化を明らかにし、セルラーゼによる反応との違いを見出すことに成功した。本結果は、セルロース分解に携わるタンパク質の新規反応機構を明らかにしただけでなく、セルロースの加水分解反応を促進する新たな因子としてバイオマスの有効利用において活用できる可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study has succeeded in elucidating a role and a reaction mechanism of swollenin in degradation of cellulose by cellulases. In addition, it was revealed that structural change of cellulose by the action of swollenin and succeeded in finding the difference with the reaction mechanisms of cellulases. These results provide new reaction mechanism of protein involved in cellulose degradation, and are useful as a factor to promote enzymatic degradation of cellulose.

研究分野：酵素化学

キーワード：セルロース分解 セルラーゼ バイオマス分解

1. 研究開始当初の背景

申請者は、これまでにセルロースの酵素分解による効率的糖化技術の開発を研究してきた。その中で、セルラーゼによるセルロースの加水分解反応では以下のような問題が生じ、酵素反応の円滑な進行に悪影響を及ぼしている事を明らかにした。

- ・天然のセルロースは強固な結晶構造をしているために、酵素の反応性が著しく低い。
- ・固液界面における反応のため、糖化効率が著しく低い。
- ・低酵素濃度では基質が残っていても、何らかの理由で反応が途中で停止する。

しかしながら、自然界の微生物は、いとも簡単にセルロースを分解しているように観察される。そこで、これら問題を解決するために微生物に本来備わっている加水分解酵素以外の分解補助機能に着目し、それを模倣し利用することを考えた。*T. reesei* はゲノムプロジェクトが終了し、その遺伝情報を利用することが可能である。その中で、植物の細胞壁伸長に關与する Expansin と相同性をもつ Swollenin が候補にあがってきた。Swollenin はセルロースを膨潤させること、およびセルラーゼと同調して分泌されることが報告されている。すなわち、Swollenin はセルラーゼの分解補助機能をもつ可能性があり、その役割を解明することが上記の問題を解決する重要な糸口になると推量された。

2. 研究の目的

強力なセルラーゼ生産菌である *Trichoderma reesei* は、各種セルラーゼとともに Swollenin というセルロース膨潤タンパク質を生産する。これは、植物の細胞壁伸長に關与する Expansin と同じ機能をもつと考えられる。すなわち、Swollenin はセルロースマイクロフィブリル間の水素結合を切断し、セルラーゼによる加水分解を促進することが推定される。本研究では、この独特な作用メカニズムを解明するために2つの目的を設定する。(1) 一次構造の相同性が高いセルラーゼや Expansin のアミノ酸配列情報に基づいて、Swollenin の機能発現に關与するアミノ酸残基を特定し、その反応機構を解明する。(2) Swollenin によって膨潤したセルロースについて、その分子構造や化学的性質を解明し、セルラーゼの加水分解反応に及ぼす効果を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) Swollenin によって膨潤したセルロースの構造解析

Swollenin によって膨潤したセルロースの構造を機器分析によって調べ、膨潤のメカニズムを基質側から解明する。

(2) Swollenin のセルラーゼに対する活性促進効果

各種基質を使用して Swollenin のセルラーゼ活性促進効果を調査する。また、作用機作の異なるセルラーゼに対して活性促進効果の違いを調査する。

(3) セルロースに対するセルロースの膨潤は、Swollenin による加水分解反応によって引き起こされるのか

膨潤活性を数値化し、加水分解活性と比較する。加水分解酵素(Cel45A)と Swollenin の両方で実施し、両活性の関連性を調べることで Swollenin の反応機構を明らかにする。

(4) セルロース膨潤に關与するアミノ酸残基の特定

Swollenin の加水分解生成物のアノマー型を決定し、加水分解の反応機構を決定する。これによって、活性中心のアミノ酸の種類が推定できる。さらに、Swollenin の一次構造を相同性が高い Expansin や Cel45A の活性中心と比較することで、触媒アミノ酸残基の候補を選び出す。これらの変異体を作製し、セルロースの膨潤または加水分解活性に対する影響を調査する。

4. 研究成果

(1) Swollenin によって膨潤したセルロースの構造解析

Swollenin が作用することでセルロース繊維に生じる形態的变化を観察した。図1はその走査電子顕微鏡写真である。基質として使用した脱脂綿(結晶性セルロース)は、セルロース分子が水素結合によって密に会合した滑らかな表面形態を示す。これを各種セルラーゼで分解すると、表面に深いクラックや薄く削いだような構造が確認できた。一方、Swollenin を作用させたものは、毛羽立ちが生じて一部のマイクロフィブリルが繊維本体から剥がれた状態が観察された。この時、セルロースの分解物であるセロオリゴ糖は全く検出されなかった。このような形態を生じさせる酵素はこれまでに例がなく、Swollenin は新規な反応機構でセルロースに作用していることが考えられた。剥離したセルロース断片は、基質の表面積を増加させセルラーゼの反応点が増えることで分解反応を促進することが期待された。また、XRD によってセルロースの結晶化度を測定したところ、明らかな変化は確認できなかった。このことは、Swollenin が引き起こす形態変化は繊維表面のごく一部にすぎず、内部構造に影響を及ぼしていないことが原因であると

考えられた。今回、Swollenin 処理によってセルロースのミクロな形態変化が観察されたが、光学顕微鏡で観察可能なマクロなレベルで変化を見つけることはできなかった。

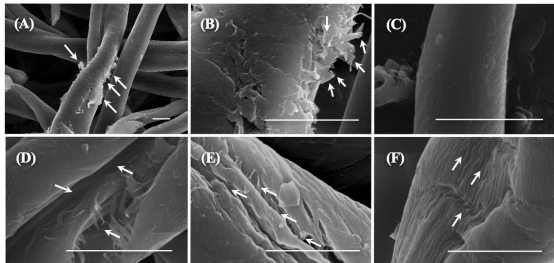


図1 Swollenin およびセルラーゼ処理した脱脂綿の走査電子顕微鏡観察

(A)および(B), Swollenin 処理; (C), 蒸留水で処理; (D) Ex-1 処理; (E), Ex-3 処理; (F), En-1 処理; 図中の直線は、10 μm を表す。

(2) Swollenin のセルラーゼに対する活性促進効果

図2は、様々なセルラーゼ濃度における Swollenin の添加効果を経時的に調べた結果である。セルラーゼの濃度が高い場合には、Swollenin の分解促進効果は少なかった。逆に、極微量のセルラーゼが存在する場合、分解促進効果は極めて大きくなった。また、この分解促進効果は Swollenin の添加濃度に依存して高くなることも確認している。十分量のセルラーゼがある場合は、セルロースの分解が順次起こり、酵素の反応点が十分に存在するため Swollenin の添加効果はと考えられる。一方、セルラーゼ濃度が低い場合には、Swollenin の添加がより効果的であると考えられた。

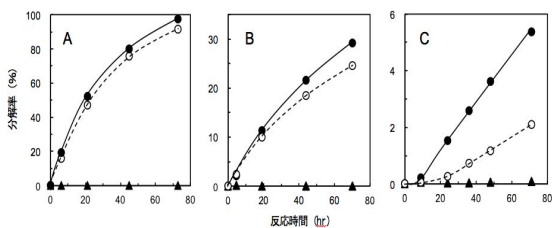


図2 Swollenin によるセルラーゼの活性促進効果

反応条件 (5 ml): マーセル化ろ紙 (1×3 cm), 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0), Swollenin 50 μg, Accellerase 1500 0.26 FPU (A), 0.013 FPU (B), 0.0013 FPU (C). 40, 120 rpm にて反応させた。●, Swollenin + セルラーゼ; ○, セルラーゼのみ; ▲, Swollenin のみ。

一方、各種セルラーゼ成分に対する Swollenin の添加効果を調査した結果を図3に示す。Swollenin は、全てのセルラーゼに対して活性促進効果を示した。特に、エキソ型セルラーゼに対する添加効果が高く、

Swollenin がエンド型にセルロースを加水分解することからも支持される結果であった。

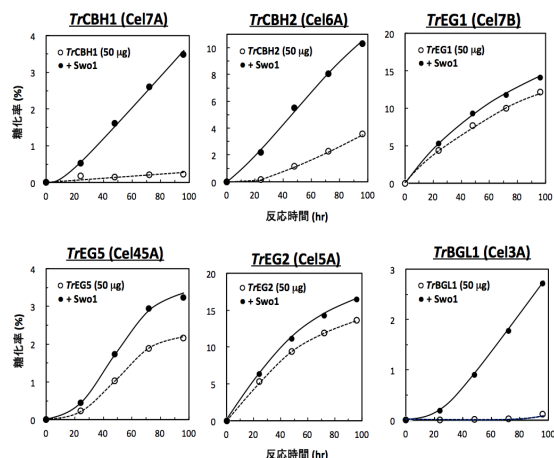


図3 各種セルラーゼに対する活性促進効果

(3) セルロースに対するセルロースの膨潤は、Swollenin による加水分解反応によって引き起こされるのか

Swollenin によるセルロースの膨潤活性と加水分解活性の関連性を調査した。セルロースの膨潤活性は、セルラーゼの活性促進の度合いによって評価した。Cel45A と Swollenin の加水分解活性を統一し、結晶性セルロースに作用させたところ、Cel45A の方が重合度の低下が進行した。しかし、これらセルロースに対するセルラーゼの反応性は、Swollenin 処理した方が Cel45A 処理したものよりも約2倍分解が促進された。これらの結果は、Swollenin のセルラーゼ活性促進効果は加水分解力に起因するだけでなく、その他の要因も関連していることを示唆している。

(4) セルロース膨潤に關与するアミノ酸残基の特定

Swollenin によるセルロース膨潤の反応機構を解明するために、活性中心アミノ酸残基の特定を試みた。Swollenin が作用して生じる生成物のアノマー型は α 型であり、反転型の反応機構を有することが明らかとなった。これは、一次構造が類似した Cel45A の生成物 α 型と同じであった。Glycoside hydrolase family 45 の活性中心は、大部分がアスパラギン酸であり、Swollenin も同様であることが推定された。Swollenin に存在する Asp を Asn または Ala に置換した変異体を 19 種類作製した。全ての Swollenin 変異体を完全精製し、セロペンタオース (G5) に対する反応性から加水分解活性の有無を調査した。その結果、野生型の Swollenin は、G5 を G2 と G3 に加水分解するのに対し D304N および D342N 変異体において顕著な加水分解活性の低下が確認された。さらに、これらア

ミノ酸残基をAlaに置換した変異体では、加水分解活性が完全に消失した。以上の結果から、Swolleninの弱い加水分解活性は、反転型セルラーゼと同様の反応機構で2つの酸性アミノ酸残基を介して行われることが明らかとなった。

一方、これら変異型Swolleninを使用して、セルラーゼ活性促進効果を測定した。加水分解活性が低下したSwollenin変異体は、セルラーゼ活性促進効果が著しく減少していることを明らかにした。

(5)総括と展望

*T. reesei*由来Swolleninは、極低濃度のセルラーゼが存在するときに活性促進効果を示した。これは、自然界で極限られた量のセルラーゼによってより広範囲のセルロースを分解するために、効果的であると考えられる。

Swolleninは、セルロースに対して極弱い加水分解活性を示し、反転型加水分解酵素の一種と考えられた。加水分解活性とセルラーゼ活性促進効果の関連性が高いことを明らかにした。しかし、同レベルの加水分解活性を示すセルラーゼと比較して、Swolleninの活性促進効果は著しく高かった。この結果は、Swolleninのセルラーゼ活性促進効果には、その他の要因も関与していることを示唆している。

本結果は、セルロース分解に携わるタンパク質の新規反応機構を明らかにしただけでなく、セルロースの加水分解反応を促進する新たな因子としてバイオマスの有効利用において活用できる可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計3件)

野崎功一、石井哲郎、天野良彦、*Trichoderma reesei*由来Swollenin反応機構の解明、日本応用糖質科学会平成28年度大会、2016.9.14-16、広島県福山市・学校法人福山大学宮地茂記念館

野崎功一、石井哲郎、水野正浩、天野良彦、*Trichoderma reesei*由来Swolleninによるセルロース分解促進効果、第28回セルラーゼ研究会、2014.7.11、千葉県習志野市・幕張セミナーハウス

Nozaki K, Mizuno M, Amano Y, Function and mechanism of swollenin on cellulose degradation, The 13th Bratislava Symposium on Saccharides "Recent Advances in

Glycomics", 2014.6.22-26, Smolence in Slovakia

[その他]

ホームページ

<http://www.shinshu-u.ac.jp/faculty/engineering/chair/chem010/research6.html>

解説

野崎功一、セルロース分解を補助する謎のタンパク質、生物工学会誌(バイオメディア)、93(11)、695(2015)

解説

野崎功一、セルラーゼの酵素反応を促進する新規タンパク質(スオレニン)の機能解析技報こまくさ(信州大学工学部)、11、17-21(2013)

6. 研究組織

(1)研究代表者

野崎 功一(NOZAKI, Kouichi)

信州大学・学術研究院工学系・准教授

研究者番号：10313834